

高唐栝楼茎尖分生组织培养与快速繁殖技术研究

彭向前, 李光勇, 刘辉, 张静静 (聊城大学药学院, 山东聊城 252059)

摘要 [目的]采用茎尖分生组织培养脱毒技术培育高唐栝楼的脱病毒试管苗。[方法]对添加不同浓度外源生长调节剂的培养基进行一系列优化试验,筛选出高唐栝楼脱毒试管苗最佳繁殖培养基。[结果]在MS+2.0 mg/L 6-BA +0.1 mg/L NAA+0.10 mg/L KT培养基中诱导效果较好,技术上达到了快速繁殖规模生产的要求。经反复的病毒检测,证明脱毒试管苗脱病毒彻底。[结论]最终获得了高唐栝楼茎尖培养脱毒与诱导、增殖和生根的培养基,及其生长所需要的外部环境条件和相关配套技术。

关键词 高唐栝楼;脱毒;茎尖分生组织;组织培养;快速繁殖

中图分类号 S567.23 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2018)25-0081-03

Technology System for Stem-apex Meristem Culture and Rapid Propagation of *Trichosanthes kirilowii* Maxim.

PENG Xiang-qian, LI Guang-yong, LIU Hui et al (College of Pharmaceutical Sciences, Liaocheng University, Liaocheng, Shandong 252059)

Abstract [Objective] Virus-free seedling in test tube of *Trichosanthes kirilowii* Maxim. was obtained from stem-apex meristem culture *in vitro*. [Method] A series of optimization experiments for propagative medium composition and concentration of phytohormones were investigated with a view to accelerate the propagation of virus-free seedling in test tube of *T. kirilowii* Maxim. [Result] The most suitable rapid propagative medium of *T. kirilowii* Maxim. was MS+2.0 mg/L 6-BA +0.1 mg/L NAA+0.10 mg/L KT. These results could meet the technology requirements of rapid propagation in large scale production. Virus-free seedlings in test tube were tested repeatedly, which had no virus completely. [Conclusion] The cultural mediums of detoxification and induction, proliferation and rooting were obtained as well as the external environmental conditions for the plant growth and matching technology.

Key words *Trichosanthes kirilowii* Maxim.; Virus-free; Stem-apex meristem; Tissue culture; Rapid propagation

高唐栝楼(*Trichosanthes kirilowii* Maxim.)为葫芦科栝楼属多年生攀缘草本植物,有润肺化痰、养胃生津、利气宽胸等作用^[1]。高唐栝楼为山东省1种地道药材,其个大质优,在国内外享有较高的知名度,近年来面积不断扩大,而优质种苗却供应不足。栝楼繁殖一般有种子繁殖和分根繁殖2种方法,但栝楼雌雄异株,且开花前无明显形态差异,难以分辨,种子繁殖后常出现雄株多(雌雄株比例约为3:7)的现象,影响了产量和经济效益,而用分根繁殖,由于块根本身属于药材,同时块根繁殖量不大,且常年无性繁殖会引起种源退化严重,导致优质高唐栝楼种苗数量少^[2]。

植物组织培养具有繁殖系数大、脱病毒复壮的优点^[3],组织培养方法应用在栝楼上已有报道,但有关高唐栝楼的组培研究鲜见报道。笔者采用高唐栝楼块根诱导产生幼芽,对幼芽的茎尖分生组织进行培养得到大量的高唐栝楼脱毒试管苗,不仅提高了高唐栝楼的繁殖系数,而且提高了高唐栝楼的产量与质量。

1 材料与方

1.1 材料 供试材料为国家地理标志产品高唐栝楼,取株高唐栝楼根,并做好标记。

1.2 方法

1.2.1 供试材料处理。选取无病害且饱满健壮的雌株高唐栝楼根,用自来水将其冲洗干净后,埋于干净的砂土中,保持良好的通风环境,在(25±1)℃条件下进行催芽。待高唐栝楼根上的幼芽高度达1.0~1.5 cm时剥取长势良好的幼芽,蒸

馏水冲洗5次,置于45℃恒温培养箱中处理5 min,进行脱毒。

将脱毒的幼芽用无菌水冲洗后置于75%乙醇溶液30 s,置于5%次氯酸钠溶液浸泡10 min,取出后用无菌水冲洗6次,置于4℃冰箱,备用。

1.2.2 培养基对茎尖成苗的影响。取高唐栝楼茎尖分别接种于MS、B₅和LS这3种培养基上诱导芽丛,3种培养基均不添加任何外源生长调节剂,计算成苗率,选择培养基。

1.2.3 茎尖大小和成活率关系。剥取不同长度高唐栝楼茎,分别接种到初代培养基MS+0.5 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA,茎尖明显变绿说明已经成活,比较茎尖大小和成活率的关系。

1.2.4 初代培养。配制初代培养基MS+0.5 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA,分装于培养瓶后进行灭菌处理。取备用幼芽,借助解剖镜剥取0.2~0.5 mm的茎尖作为组织培养的外植体,每瓶接种1个,用玻璃纸包扎好瓶口,置于人工气候室,培养环境为光照强度1500 lx,温度(25±1)℃,光照时间12 h/d,并设置暗时温度(18±1)℃。培养7 d后,观察培养的茎尖明显膨大,呈浅黄色,茎尖随培养时间增长逐渐转绿,20 d后茎尖呈翠绿色。

1.2.5 继一代培养。初代培养20 d后就可以准备进行继一代培养,诱导高唐栝楼幼芽分化,形成芽丛。在第25天进行转接,继一代培养的培养基、光照和温度等培养条件采用初代培养的条件。第45天大多数的幼芽高度可达2~3 cm,切下芽丛进行继二代培养。

1.2.6 病毒检测。从继一代培养的芽丛上选择1个幼芽,采用酶联免疫吸附法(ELISA)对其进行病毒检测。根据检测结果,选择已完全脱去病毒的芽丛进行继二代培养。

1.2.7 继二代培养和繁殖培养基筛选试验。高唐栝楼继一

基金项目 聊城市科技计划项目(2014GJH05);国家级大学生创新创业训练计划项目(201510447009)。

作者简介 彭向前(1979—),男,河南扶沟人,副教授,硕士,从事中药现代化研究。

收稿日期 2018-04-23

代培养幼芽进行继二代培养后,观察到采用初始培养基培养的试管苗比较瘦弱,且易玻璃化,因此,对繁殖培养基的配比进行优化筛选。采用正交试验 $L_9(3^4)$,探讨 6-BA、NAA、KT 这 3 种外源外源生长调节剂对培养效果的影响(表 1)。

表 1 高唐栝楼繁殖培养基正交试验因素与水平

水平 Level	因素 Factor		
	A. 6-BA	B. NAA	C. KT
1	0.5	0.1	0
2	1.0	0.2	0.05
3	2.0	0.4	0.10

以试管苗平均生长率为培养指标,筛选最适繁殖培养基的配比。试管苗平均生长率=(30 d 后材料重-接种时材料重)/接种时材料重^[4]。

1.2.8 生根与炼苗。取高约 1.5 cm 的试管苗接种于生根培养基中进行生根,生根培养基等同于初代培养基。7 d 后试管苗开始生根,待试管苗高度为 5~6 cm、根为 3~5 条时,揭盖炼苗,控制温度(25±1)℃、相对湿度 90% 以上。为防止幼苗失水,在培养瓶中加少许清水,第 1~3 天瓶盖半开半遮,第 4 天完全去掉瓶盖。

1.2.9 移栽驯化。将炼苗后的试管苗取出,用清水冲去根上附着的培养基,用多灵 1 000 倍液蘸根,移栽到营养钵,置于户外简易人工气候室苗床中进行驯化,第 1~7 天控制温度(25±1)℃、相对湿度 90% 以上,第 7 天后,控制温度在 20~30℃,并逐渐加大通风量,降低湿度,同时增加自然光照强度和ación,使高唐栝楼幼苗逐渐适应自然环境。

2 结果与分析

2.1 不同培养基对茎尖成苗的影响 取高唐栝楼茎尖分别接种于 MS、B₅ 和 LS 这 3 种培养基上,诱导芽丛,3 种培养基中均不添加任何外源生长调节剂,诱导结果见表 2。3 种培养基均能诱导芽丛的产生,成苗率为 85.0% 以上。在 MS 培养基中成苗率较高,且芽丛健壮,B₅ 和 LS 这 2 种培养基中的芽瘦弱,且成苗率相对较低。因此,选择 MS 作为主要培养基。

表 2 不同培养基对茎尖成苗的影响

培养基 Medium	茎尖数 Stem tip number 个	成苗数 Seedling number 个	成苗率 Seedling rate %
MS	20	20	100
B ₅	20	18	90.0
LS	20	17	85.0

2.2 茎尖大小和成活率关系 取备用的高唐栝楼幼苗,剥取不同长度的茎尖,分别接种到初始培养基,茎尖明显变绿说明茎尖已经成活。茎尖大小和成活率的关系见表 3。

高唐栝楼脱毒过程中,剥取的茎尖大容易成活,但相应的芽丛携带病毒的概率变大,达不到脱毒的效果;剥取的茎尖小携带病毒的概率降低,但成活率不高,主要由于过小的

茎尖顶端含有细胞数目少,导致细胞进一步分裂分化的可能性小^[4]。

表 3 茎尖大小和成活率的关系

茎尖大小 Stem tip size mm	接种茎尖数 Number of inoculation stem tip//个	成活率 Survival rate %	脱毒率 Virus elimination rate//%
0.2 以下	20	30.0	100
0.3	20	65.0	100
0.4	20	80.0	93.4
0.5 以上	20	95.0	89.4

0.2 mm 以下的茎尖容易干枯死亡,且成活率低。经过比较茎尖大小和成活率的关系,发现剥取 0.2~0.5 mm 的茎尖分生组织培养可以取得较好的效果,因剥取的茎尖相对较小,容易脱水死亡,所以剥取茎尖动作要迅速。

2.3 繁殖培养基的筛选 从表 4 可以看出,3 种外源生长调节剂对试管苗平均生长率的影响大小为 A(6-BA)、C(KT)、B(NAA)。A(6-BA)因素与试管苗生长率有极显著意义($P<0.01$),C(KT)因素与试管苗生长率有显著意义($P<0.05$),而 B(NAA)因素与试管苗生长率没有显著意义,在正交试验中 9 种培养基试管苗生长率最高为 50.2%。优化筛选出高唐栝楼的最佳繁殖培养基为 A₂B₁C₃,即 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA+0.10 mg/L KT,用筛选得到的最佳培养基进行高唐栝楼试管苗继二代培养,试管苗比较健壮,没有出现玻璃化苗,试管苗生长率为 60.5%。

表 4 高唐栝楼繁殖培养基 $L_9(3^4)$ 正交试验结果

Table 4 Orthogonal test results of $L_9(3^4)$ propagation medium of *Trichosanthes kirilowii* Maxim.

序号 No.	因素 Factor			误差 Error	生长率 Growth rate %
	A	B	C		
1	1	1	1	1	30.2
2	1	2	2	2	30.3
3	1	3	3	3	47.6
4	2	1	2	3	50.2
5	2	2	3	1	43.4
6	2	3	1	2	40.1
7	3	1	3	2	32.4
8	3	2	1	3	31.5
9	3	3	2	1	30.2
k_1	30.100	39.167	35.200	37.167	
k_2	47.067	37.600	36.433	37.900	
k_3	34.667	35.067	40.200	36.767	
极差 Range	16.967	4.100	5.000	1.133	

2.4 脱毒高唐栝楼苗的病毒检测 对移栽驯化成活后的高唐栝楼脱毒苗进行病毒检测。检测时随机取样,采集叶片 1 g 置于研钵中,加入 10 mL 水和 5 mL 磷酸缓冲液(0.1 mol/L)研磨,取液分别涂抹于叶片 2~3 次,用 600 目金钢砂轻轻磨擦,5 min 后用清水冲洗叶面,30 d 后观察叶片的发病情况^[5]。检测结果显示,高唐栝楼脱毒苗的脱毒率为 100%。

3 结论与讨论

该试验以高唐栝楼茎尖作为外植体,采用茎尖分生组织培养脱毒技术,不经历愈伤组织,一次性成苗,比经历愈伤组织后再转移到分化培养基生根发芽要快,还不会出现遗传上的不稳定性和变异性,同时还能简化育苗程序^[6],降低生产成本。该试验通过高唐栝楼茎尖组织培养,建立了高唐栝楼快速繁殖体系,解决了高唐栝楼以种子繁育雌雄比例不协调的问题,可大量提供优质高唐栝楼组培苗,降低繁育成本,加速优质种苗的繁育进程^[7],同时对高唐栝楼种苗的品种更新及品种遗传改良具有一定的指导意义。

外植体能否再生成功,在很大程度上取决于所选植物的基因型对培养基的适合程度。在培养基的选择上,加入微量外源生长调节剂对茎尖分生组织发育有促进作用,可明显提高高唐栝楼茎尖的成活率,但高浓度的细胞分裂素对芽丛的诱导有利,同时会抑制植物本身生长素的产生,这样植株叶绿素等成分合成无法跟上植物细胞分裂的速度,会产生黄绿色略透明的玻璃化苗^[8]。该研究在比较 MS、B₅、LS 这 3 种培养基对茎尖成苗影响的基础上确定了 MS 作为基础培养基,并以较低浓度的 6-BA、NAA 和 KT 这 3 种外源生长调节剂

的不同配比加入到 MS 培养基中进行正交试验,最后筛选出的培养基得到了较好的培养效果。正交试验方差分析表明,6-BA 和 KT 这 2 种外源生长调节剂加入培养基对试管苗生长率的影响比较大,这表明不同基因型的植物对外源生长调节剂的敏感程度是不相同的,所以在培养基中加入外源生长调节剂时要有一定的选择性。

参考文献

- [1] 李爱峰,张永清. 栝楼的化学成分研究进展[J]. 安徽农业科学,2012,40(30):14713-14716.
- [2] 蔡宣梅,郭文杰,张洁,等. 福建省道地瓜蒌组织培养体系的建立[J]. 福建热作科技,2016,41(2):1-3.
- [3] 邵春月,高山林,陈峰,等. 怀地黄分生组织培养脱病毒及快速繁殖技术的研究[J]. 药物生物技术,2008,15(4):258-261.
- [4] 邓才生. 人参脱毒培养与快速繁殖研究[J]. 云南农业科技,2009(2):14-15.
- [5] 冯果,曾志乾,吴增光,等. 基于综合评分法的不同产地加工方法对瓜蒌药材质量的影响[J]. 安徽农业科学,2017,45(29):120-123.
- [6] 韩琳娜,聂金娥,周凤琴,等. 栝楼丛生芽快繁体系的建立[J]. 山东农业科学,2014,46(3):46-48.
- [7] 崔必波,王伟义,顾闻峰,等. 瓜蒌套种麦冬节本高产栽培技术初探[J]. 安徽农业科学,2015,43(28):75-76,101.
- [8] 马维平,黄连超,顾红卫,等. 荆半夏组织培养及快速繁殖的研究[J]. 西北药学杂志,2006,21(2):57-59.
- [9] 毛巧芝,赵忠,马希汉,等. 苦杏仁木醋液抑菌活性和化学成分分析[J]. 农业机械学报,2010,41(2):164-170.
- [10] 陈银基,鞠兴荣,周光宏. 饱和脂肪酸分类与生理功能[J]. 中国油脂,2008,33(3):35-39.
- [11] 赵敏. 亚油酸及亚油酸甲酯的抗炎作用研究[D]. 成都:西南交通大学,2012.
- [12] 黄攀,陆燕,茆干干,等. 日粮多不饱和脂肪酸对畜禽肉品质的影响[J]. 畜牧与兽医,2008,40(12):93-95.
- [13] 李庆岗,程荣斌. 猪肉内脂肪酸的研究进展[J]. 中国畜牧兽医,2004(5):13-15.
- [14] 张君正,王巍,张敏. 木醋液对育肥猪肉肉质性状的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医,2010(7):95-97.
- [15] 孔祥霞,郭均友,单晓飞. 木醋液与抗生素对育肥猪肉品质的影响[J]. 山东畜牧兽医,2015,36(2):3-5.
- [16] 李大光. 五味子、枸杞子和松针粉制剂在育肥猪生产上的应用[D]. 延吉:延边大学,2007.
- [17] YU Q P, FENG D Y, XIA M H, et al. Effects of a traditional Chinese medicine formula supplementation on growth performance, carcass characteristics, meat quality and fatty acid profiles of finishing pigs[J]. Livestock science, 2017, 202:135-142.
- [18] JIANG H, ZHOU T Z, LI X G, et al. Antimicrobial activity of compound traditional Chinese medicine feizhu powder[J]. Advanced materials research, 2013, 781-784:1064-1067.
- [19] 张娜娜,曹洪战,芦春莲. 氨基酸对猪肉品质影响的研究进展[J]. 现代畜牧兽医,2015(12):24-27.
- [20] 张伟力. 猪肉的风味[J]. 养猪,2003(2):47-50.
- [21] 孙震,边连全. 中草药饲料添加剂对鸭各项肉质指标的影响[J]. 现代畜牧兽医,2006(5):17-19.
- [22] 任杰,曹日亮,武果桃,等. 复方中药对猪肉中 4 种鲜味氨基酸含量的影响[J]. 养猪,2014(6):52-54.
- [23] 王冉,周岩民. 动物蛋氨酸营养研究进展[J]. 粮食与饲料工业,1999(4):29-32.
- [24] YAMAUCHI K, MANABE N, MATSUMOTO Y, et al. Increased collagen III in culled chicken meat after feeding dietary wood charcoal and vinegar contributes to palatability and tenderness[J]. Animal science journal, 2014, 85(4):468-480.

(上接第 80 页)

提高猪肉中的必需氨基酸含量与风味氨基酸的含量,极大提高了猪肉的营养价值和增强了猪肉的风味,极大提高了猪肉的商品价值。孙震等^[15]研究表明中草药饲料添加剂可以增加鸭肉中氨基酸总量、鲜味氨基酸和必需脂肪酸。任杰等^[16]研究表明,中草药添加剂具有天然性、多功能性等优点,可以改善猪肉中氨基酸的含量。王冉等^[17]研究表明日粮中适当添加蛋氨酸可使猪体重增加 6.1%~15.3%,饲料消耗减少 5.5%~13.2%。该试验中 C 组蛋氨酸含量比 A 组提高了 10.0%,存在极显著差异($P < 0.01$)。Yamauchi 等^[18]研究表明饲喂木醋液后,鸡胚肉中的胶原蛋白 III 增加,有助于提高鸡肉适口性和嫩度。

3.3 猪肉中重金属残留量分析 该试验中各组猪肉的重金属残留浓度均符合国家标准,均低于我国无公害猪肉的行业标准。这表明育肥猪日粮中添加中药制剂与木醋液添加剂并未对猪肉产生不利影响,可安全使用。

4 结论

与单独使用中药制剂和单独使用木醋液相比,中药制剂与木醋液配合使用可显著提高猪肉中有益不饱和脂肪酸的含量和猪肉中风味氨基酸和必需氨基酸的含量,显著改善猪肉的风味并提高其商品价值。

参考文献

- [1] 刘长风,李敏,高品一,等. 木醋液的来源、成分及其应用研究进展[J]. 中国农学通报,2016,32(1):28-32.
- [2] 朴哲,闫吉昌,崔香兰,等. 木醋液的精制及有机成分研究[J]. 林产化学与工业,2003,23(2):17-20.